

ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЦЕРКАРИЙ
CRYPTOCOTYLE LINGUA (HETEROPHYIDAE)

О. О. Толстенков,¹ В. В. Прокофьев,²
Н. Б. Теренина,¹ К. В. Галактионов³

¹ Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН,
Ленинский проспект, 33, Москва, 119071
E-mail: otolo@mail.ru

² Псковский государственный педагогический университет,
пл. Ленина, 2, Псков, 180760
E-mail: prok58@mail.ru

³ Зоологический институт РАН,
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
E-mail:kirill.galaktionov@gmail.com

Поступила 13.01.2010

Исследовано влияние растворов биологически активных веществ (ацетилхолин, серотонин, октопамин, нитропруссид натрия, FMRF-амид) на двигательную активность церкарий *Cryptocotyle lingua*. Растворы FMRF-амида, октопамина, нитропруссида натрия не вызвали статистически достоверных изменений двигательной активности церкарий, в то время как растворы сертонаина и ацетилхолина вызывали увеличение продолжительности активной фазы плавания. Для выяснения механизмов, лежащих в основе двигательной активности церкарий, требуются дальнейшие исследования.

Ключевые слова: *Cryptocotyle lingua*, trematodes, cercariae, neuromediators, serotonin, acetylcholine.

В сложном жизненном цикле трематод церкарии играют роль расселительной личинки половозрелой особи гермафродитного поколения — мартыры, паразитирующей в окончательном хозяине. У большинства трематод церкарии свободны во внешней среде и их главная биологическая задача заключается в поиске и заражении животного-хозяина. Для успешного ее решения личинки обладают сложным набором морфофункциональных, биологических и поведенческих адаптаций (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). В настоящее время существуют многочисленные публикации, посвященные изучению различных аспектов поведения церкарий (Combes et al., 1994, 2002; Haas, 1994; Sukhdeo, Sukhdeo, 2004). Вместе с тем работы, которые затрагивали бы физиологические основы поведения церкарий, крайне мало (Prior, Uglem, 1979; Smith, Halton, 1983; Young et al., 1988, и др.).

Среди описанных в литературе церкарий можно выделить виды, характер плавания которых поддается четкой интерпретации, что позволяет использовать их в качестве моделей при изучении особенностей двигательной активности этих личинок. Одной из таких моделей может послужить церкария *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) (Heterophyidae), которой присущ дискретный тип плавания, включающий две фазы движения: актив-

ную и пассивную (Chapman, Wilson, 1973; Chapman, 1974; Haas, 1994; Прокофьев, 2005). Эта личинка и была использована в нашем исследовании, целью которого стало выяснение влияния некоторых биологически активных веществ, обнаруженных в нервной системе плоских червей и выполняющих функцию нейромедиаторов (Halton, Maule, 2004; Ribeiro et al., 2005), на двигательную активность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Переднежаберных моллюсков *Littorina littorea*, инвазированных партенитами и личинками *Cryptocotyle lingua*, собирали на литорали губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря в окрестностях Беломорской биологической станции ЗИН РАН в августе 2008 г. Для выявления зараженных особей моллюсков рассаживали поодиночке в сосуды с морской водой, которые экспонировали под ярким источником света (солнце или мощная электрическая лампа). Сочетание интенсивного освещения и возрастающей температуры воды стимулировало выход церкарий из зараженных моллюсков. Инвазированных особей отсаживали в отдельный сосуд и использовали при дальнейшей работе в качестве источника зрелых церкарий.

Перед проведением наблюдений зараженных моллюсков помещали в сосуд с морской водой и в течение 30 мин освещали светом настольной лампы при $E = 20\,000—30\,000$ лк. Затем моллюсков удаляли, а выделившихся личинок использовали для проведения опытов.

Эксперименты выполняли только на молодых церкариях возраста 4—6 ч. Именно на этот возраст приходится пик активности церкарий изучаемого вида (Прокофьев, 1999). Личинку помещали в микроаквариум объемом 25 мм^3 (диаметр 4 мм, высота 2 мм), заполненный морской водой. Микроаквариум с церкарией располагали на столике бинокуляра МБС-9, с помощью которого проводили наблюдения. Освещенность во время выполнения экспериментов поддерживалась на постоянном уровне 4000—6000 лк, температура — 18—20 °C.

Наблюдения проводили по следующей схеме. В контролльном эксперименте личинку помещали в чистую морскую воду и в течение 5 мин регистрировали ее двигательную активность. Затем воду меняли на раствор исследуемого вещества, выдерживали паузу, продолжительностью в 1 мин, после чего в течение 5 мин регистрировали характер плавания церкарии.

В качестве тестируемых агентов использовали следующие биологически активные вещества: ацетилхолин хлорид, серотонин, октопамин, нитропруссид натрия, FMRF-амид (Sigma, США). Вначале применяли растворы исследуемых веществ в концентрации 1×10^{-6} М, считающейся «физиологической» для плоских червей (Hrgcová et al., 2002). Затем в случае регистрации достоверных изменений двигательной активности изучали действие других концентраций веществ как в сторону увеличения, так и уменьшения с градацией 10^{-1} М. Для получения растворов вещества разводились в морской воде. В работе применяли только свежеприготовленные растворы.

Регистрацию движений личинки производили путем визуального наблюдения под бинокуляром. При этом у исследуемых церкарий при помо-

щи секундомера измеряли продолжительность активных фаз движения (плавания) и подсчитывали их число за период наблюдения. В случае, если продолжительность движения тестируемой особи была менее 1 с, она приравнивалась к 1 с.

При анализе экспериментальных данных учитывались следующие параметры двигательной активности: общая продолжительность плавания (сумма продолжительности всех активных фаз за время эксперимента), средняя продолжительность активной фазы плавания и число активных фаз.

Для каждого эксперимента использовали не менее 10 церкарий, полученных от разных зараженных моллюсков. Статистическая обработка включала в себя расчет ошибки средней и оценку уровней значимости различий сравниваемых параметров движения в контроле и опыте с помощью критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Растворы FMRF-амида, октопамина, нитропруссида натрия в концентрации 1×10^{-6} М не вызвали статистически достоверных изменений регистрируемых параметров двигательной активности церкарий *C. lingua*. Иная картина наблюдалась при использовании в качестве тестируемых агентов серотонина и ацетилхолина. Растворы серотонина вызывали статистически достоверное увеличение общей продолжительности плавания (в концентрациях от 1×10^{-3} — 1×10^{-12} М) и средней продолжительности фазы плавания (в концентрациях 1×10^{-3} М, 1×10^{-8} — 1×10^{-11} М и 1×10^{-14} М) (табл. 1). При этом количество фаз движения достоверно не изменялось даже при высоких концентрациях веществ.

Растворы ацетилхолина вызывали статистически достоверное увеличение суммарной продолжительности плавания и средней продолжительности активной фазы плавания только при сравнительно высоких концентра-

Таблица 1
Изменение параметров двигательной активности церкарий *Cryptocotyle lingua*
под действием серотонина

Table 1. Change of the parameters of locomotor activity in the *Cryptocotyle lingua* cercaria

Параметры \ Концентрация (М)	1×10^{-3}		1×10^{-6}		1×10^{-8}		1×10^{-9}	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Продолжительность плавания, с	47.6 ± 11.8	*160.4 ± 20.2	36.5 ± 8.1	*58.6 ± 10.1	56.2 ± 14.9	*163.9 ± 25.0	39.2 ± 6.1	*77.3 ± 10.9
Количество активных фаз	19.9 ± 5.2	*21.2 ± 4.3	19.8 ± 6.3	25.7 ± 6.4	13.3 ± 3.9	7.7 ± 1.3	21.0 ± 2.9	17.8 ± 1.6
Средняя продолжительность активной фазы, с	2.0 ± 0.5	*11.0 ± 2.3	2.6 ± 0.4	4.5 ± 1.3	4.6 ± 0.9	*25.3 ± 8.6	1.8 ± 0.2	*4.9 ± 0.9

Таблица 1 (продолжение)

Концентрация (M) Параметры	1×10^{-11}		1×10^{-12}		1×10^{-14}	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Продолжительность плавания, с	46.1 ± 14.2	*126.5 ± 21.3	34.5 ± 7.1	*76.0 ± 15.1	63.0 ± 12.3	95.8 ± 11.6
Количество активных фаз	17.7 ± 2.6	23.3 ± 5.4	19.3 ± 3.3	28.4 ± 4.4	13.2 ± 1.8	13.2 ± 2.0
Средняя продолжительность активной фазы, с	2.3 ± 0.6	*11.3 ± 4.1	1.8 ± 0.2	3.5 ± 1.2	5.0 ± 1.0	*8.9 ± 1.5

Примечание. * — $P \leq 0.05$.

циях вещества (1×10^{-3} — 1×10^{-4} М). Количество фаз движения достоверно снижалось лишь при самых высоких концентрациях ацетилхолина (1×10^{-3} М) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленный эффект серотонина и ацетилхолина на двигательную активность церкарий согласуется с литературными данными о возбуждающем действии этих нейрональных сигнальных веществ, широко распространенных у плоских червей (Halton, Maule, 2004; Ribeiro et al., 2005).

Таблица 2

Изменение параметров двигательной активности церкарий *Cryptocotyle lingua* под действием ацетилхолина

Table 2. Change of the parameters of locomotor activity in the *Cryptocotyle lingua* cercaria under the influence of acetylcholine

Концентрация (M) Параметры	1×10^{-3}		1×10^{-4}		1×10^{-6}	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Продолжительность плавания, с	52.6 ± 6.6	*136.1 ± 19.6	83.1 ± 8.0	*111.6 ± 5.4	49.8 ± 7.0	59.7 ± 5.2
Количество активных фаз	26.8 ± 3.6	*6.4 ± 0.8	39.1 ± 4.1	32.2 ± 3.0	28.8 ± 5.0	32.9 ± 4.0
Средняя продолжительность активной фазы, с	2.0 ± 0.3	*23.6 ± 5.2	2.2 ± 0.1	*3.6 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2

Примечание. * — $P \leq 0.05$.

При этом активирующее действие растворов серотонина отмечается всеми исследователями. В том числе он вызывал увеличение частоты как быстрых, так и медленных волн электрической активности в хвосте у церкарий *Cercaria caribbea* LXXI (Young et al., 1988). В свою очередь ацетилхолин в большинстве описанных в литературе случаев снижал двигательную активность трематод, в частности частоту и амплитуду сокращений мышечных препаратов марит *Fasciola hepatica* (Chance, Mansour, 1953). В то же время известны немногочисленные примеры усиления двигательной активности под воздействием ацетилхолина у некоторых плоских червей (Blair, Anderson, 1993). Такие примеры противоположного действия веществ обычно принято объяснять слабой изученностью рецепторных механизмов работы нейрональных сигнальных веществ у паразитических плоских червей (Ribeiro et al., 2005).

Слабость ингибирующего действия ацетилхолина на движение церкарий *C. caribbea* LXXI связывают с высокой активностью у них холинэстеразы — фермента, расщепляющего ацетилхолин (Young et al., 1988). Возможно, что и у исследованных нами церкарий *C. lingua* при высоких концентрациях ацетилхолина резко интенсифицировалась работа холинэстеразы. Это могло привести к резкому понижению концентрации ацетилхолина даже по сравнению с нормальным уровнем, что и определило ослабление тормозного эффекта этого нейромедиатора. В результате двигательная активность церкарий при высоких концентрациях ацетилхолина в среде не понижалась, а даже повышалась, что и регистрировалось в наших экспериментах. Естественно, такая интерпретация нуждается в строгом доказательстве.

Таким образом, полученные нами данные показали, что серотонин оказывает влияние на двигательную активность церкарий *C. lingua* при различных концентрациях, вызывая увеличение продолжительности активной фазы плавания, тогда как действие ацетилхолина было выражено только при высоких концентрациях. Для выяснения механизмов, лежащих в основе двигательной активности церкарий, требуются дальнейшие исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е. Е. Воронежской и Н. Д. Крещенко за предоставленные вещества.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 08-04-00271 и 10-04-00430) и ИНТАС (№ 05-1000008-8056).

Список литературы

Прокофьев В. В. 1999. Влияние температуры и солености воды на продолжительность жизни церкарий морских литоральных трематод *Cryptocotyle* sp. (Heterophyidae), *Levinsenella brachysoma* и *Maritrema subdolum* (Micropallidae). Паразитология. 33 (6): 520—526.

- Прокофьев В. В. 2005. Особенности плавания церкарий некоторых видов trematod. *Паразитология*. 39 (3): 250—261.
- Blair K. L., Anderson P. A. V. 1993. Properties of voltage-gated ionic currents in cells from the brains of the triclad flatworm *Bdelloura candida*. *Journ. Exp. Biol.* 185: 267—286.
- Chapman H. D. 1974. The behavior of cercaria *Cryptocotyle lingua*. *Zeitchr. Parasitenk.* 66: 293—307.
- Chapman H. D., Wilson R. A. 1973. The propulsion of cercaria *Himasthla secunda* (Nicol) and *Cryptocotyle lingua*. *Parasitology*. 67: 1—15.
- Chance M. R. A., Mansour T. E. 1953. A contribution to the pharmacology of movement in the liver fluke. *Br. Journ. Pharmacol.* 8: 134—138.
- Combes C., Fournier A., Moné H., Théron A. 1994. Behaviors in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. *Parasitology*. 109 (Suppl.): 3—13.
- Combes C., Bartoli P., Théron A. 2002. Trematode transmission strategies. In: *The behavioural ecology of parasites*. Wallingford, New York: CABI Publ. 13—38.
- Galaktionov K. V., Dobrovolskij A. A. 2003. Biology and evolution of trematodes. An essay on the biology, morphology, life cycles, transmission, and evolution of digenetic trematodes. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publ. 620 p.
- Haas W. 1994. Physiological analyses of host-finding behavior in trematode cercariae: adaptations for transmission success. *Parasitology*. 109 (Suppl.): 15—29.
- Halton D. W., Maule A. G. 2004. Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Can. Journ. Zool.* 82: 316—333.
- Hrčková G., Velenbny S., Halton D. W., Maule A. G. 2002. *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*); modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine. *Parasitology*. 124: 409—422.
- Prior D. J., Uglem G. L. 1979. Behavioral and physiological aspects of swimming in cercariae of the digenetic trematode, *Proterometra macrostoma*. *Journ. Exp. Biol.* 83: 239—247.
- Ribeiro P., El-Shehabi F., Patocka N. 2005. Classical transmitters and their receptors in flatworms. *Parasitology*. 131 (Suppl.): 19—40.
- Smith J. D., Halton D. W. 1983. The physiology of trematodes. Cambridge et al. Cambridge Univer. Press. 446 p.
- Sukhdeo M. V. K., Sukhdeo S. C. 2004. Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. *Canad. Journ. Zool.* 82: 292—315.
- Young L. E., Young R. E., Bundy D. A. P. 1988. Neuropharmacological modulation of swimming activity and life span in a digenetic parasite, *Cercaria caribea* LXXI Cable. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C (2): 451—458.

EFFECT OF SOME PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES ON THE MOTILITY OF THE CRYPTOCOTYLE LINGUA CERCARIA (HETEROPHYIDAE)

O. O. Tolstenkov, V. V. Prokofiev, N. B. Terenina, K. V. Galaktionov

Key words: *Cryptocotyle lingua*, Trematoda, cercariae, neurotransmitter, serotonin, acetylcholine.

SUMMARY

The effect of some biologically active substances (acetylcholine, serotonin, octopamine, sodium nitroprussid and FMRF-amide) on the motility of the *Cryptocotyle lingua* cercariae was studied. Solutions of FMRF-amide, octopamine, and sodium nitroprussid have

no statistically significant influence on the motility of *C. lingua*. Acetylcholine and serotonin in solutions affected the motility through the prolongation of the active phase of swimming. Further research is required to elucidate the mechanisms underlying the cercarial motility.
